

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 7/64, C12P 21/04, A61K 38/13		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/04005
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	6. Februar 1997 (06.02.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/03129		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BG, BR, CA, CN, CZ, GE, HU, IL, JP, KR, LT, LV, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, US, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 17. Juli 1996 (17.07.96)			
(30) Prioritätsdaten: 95111162.4 17. Juli 1995 (17.07.95) EP			
(34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist: AT usw.			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): C-CHEM AG [CH/CH]; Hauptstrasse 67, CH-4102 Binningen (CH).		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LÜCHINGER, Jean, M. [CH/CH]; Marignano-Strasse 3, CH-4059 Basel (CH).			
(74) Anwalt: KUNZ, Ekkehard; Agrolinz Melamin GmbH, Patentabteilung, St.-Peter-Strasse 25, A-4021 Linz (AT).			

(54) Title: **CYCLOSPORIN DERIVATIVES WITH ANTI-HIV EFFECT**

(54) Bezeichnung: **CYCLOSPORIN-DERIVATE MIT ANTI-HIV-WIRKUNG**

(57) Abstract

The invention concerns new cyclic peptides of general formula (I) in which the letters A to K signify residues of the following amino acids: A a substituted homothreonine of the general formula (II): $R_1-CH_2CH(CH_3)-CH(OH)-CH(NHCH_3)-COOH$ in which R_1 is n-propyl or propenyl in which the double bond is preferably in the trans configuration, B α -aminobutyric acid, valine, norvaline or threonine, C a D-amino acid of the general formula (III): $CH_3NH-CH(R)-COOH$ in which R is straight-chain or branched-chain C_2-C_6 alkyl, alkenyl or alkynyl, whereby these groups may be substituted by hydroxy, amino, C_1-C_4 alkylamino, C_1-C_4 dialkylamino, alkoxy or acyloxy, $COOR_2$ or $CONHR_2$ in which R_2 is straight-chain or branched-chain C_1-C_4 alkyl, X- R_3 in which X is O or S and R_3 is straight-chain or branched-chain C_1-C_4 alkyl, alkenyl or alkynyl and, when X is S, R_3 may also be aryl or heteroaryl, halogen, preferably fluorine, cyano, CHR_4R_5 in which R_4 is hydrogen, methyl, ethyl or phenyl and R_5 is hydrogen, hydroxy, halogen (preferably fluorine), amino, C_1-C_4 alkylamino, C_1-C_4 dialkylamino, acyloxy (preferably acetyloxy), tert-butoxycarbonylamino-ethoxy-ethoxy-acetyloxy or alkoxycarbonyl (preferably butoxycarbonyl), D is N-methyl-gamma-hydroxyleucine or N-methyl-gamma-acetyloxyleucine, E is valine, F, I and J are each N-methylleucine, G is alanine, H is D-alanine or D-serine and K is N-methylvaline. The invention also concerns the preparation of such peptides and their use in the prevention of infection by the human immunodeficiency virus (HIV).



(57) Zusammenfassung

Neue cyclische Peptide der allgemeinen Formel (I), worin die Buchstaben A bis K Reste der folgenden Aminosäuren bedeuten: A ein substituiertes Homothreonin der allgemeinen Formel II: $R_1-CH_2CH(CH_3)-CH(OH)-CH(NHCH_3)-COOH$, in welcher R_1 n-Propyl oder Propenyl bedeutet und die Doppelbindung vorzugsweise transkonfiguriert ist, B α -Aminobuttersäure, Valin, Norvalin, oder Threonin, C eine (D)-Aminosäure der allgemeinen Formel III: $CH_3NH-CH(R)-COOH$, in der R = C_2-C_6 Alkyl, Alkenyl, Alkynyl, geradkettig oder verzweigt, wobei diese Gruppen noch durch Hydroxy, Amino, C_1-C_4 Alkylamino, C_1-C_4 Dialkylamino, Alkoxy oder Acyloxy substituiert sein können, $COOR_2$, $CONHR_2$, wobei R_2 = C_1-C_4 Alkyl, geradkettig oder verzweigt sein kann, X- R_3 , wobei X = O, S und R_3 = C_1-C_4 Alkyl, Alkenyl, Alkynyl, geradkettig oder verzweigt, und wobei wenn X = S, R_3 = auch Aryl oder Heteroaryl sein kann, Halogen, vorzugsweise Fluor, Cyano, CHR_4R_5 , wobei R_4 = Wasserstoff, Methyl, Ethyl, Phenyl, und R_5 = Wasserstoff, Hydroxy, Halogen, vorzugsweise Fluor, weiters Amino, C_1-C_4 Alkylamino, C_1-C_4 Dialkylamino, Acyloxy, vorzugsweise Acetyloxy, weiters tert-Butoxycarbonyl-amino-ethoxy-ethoxy-acetyloxy, Alkoxycarbonyl, vorzugsweise Butoxycarbonyl, D N-Methyl-gamma-hydroxy-leucin oder N-Methyl-gamma-acetyloxyleucin, E Valin, F, I, und J jeweils N-Methylleucin, G Alanin, H (D)-Alanin, (D)-Serin, und K N-Methyl-Valin deren Herstellung und Verwendung zur Behandlung und Vorbeugung von Infektionen mit dem Humanen Immundefizienzvirus (HIV).

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Cyclosporin-Derivate mit Anti-HIV-Wirkung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue cyclische Peptide aus der Cyclosporin-Reihe mit starker Hemmwirkung gegen das Humane Immunodefizienzvirus (HIV) ohne immunsuppressive Aktivität. Solche cyclischen Peptide sind unter anderem in EP 484 281 beansprucht. Eine der in dieser Patentschrift konkret beanspruchten Substanzen ist (gamma-Hydroxy-N-methyllleucin)-cyclosporin. Diese Substanz ist sehr einfach aus Cyclosporin A durch mikrobiologische Hydroxylierung herstellbar, jedoch ist in EP 484 281 die Aktivität dieser Substanz gegen HIV als etwa 5-6 mal schwächer angegeben, als jene der am stärksten aktiven Substanzen, nämlich MeLeu-4-cyclosporin oder MeVal-4-cyclosporin. Alle 3 Substanzen haben praktisch keine immunsuppressive Aktivität. Unerwarteterweise wurde gefunden, dass durch Einführung geeigneter Substituenten in die Methylengruppe der Aminosäure Sarcosin in Position 3 von (gamma-Hydroxy-MeLeu-4)-cyclosporin dessen anti-HIV Wirkung erheblich verbessert werden kann, ohne immunsuppressive Aktivitäten zu erzeugen. Da die therapeutisch verwendeten Dosen von Cyclosporin A, die nach Organtransplantationen angewandt werden, um die Abstossung der transplantierten Organe zu verhindern, sehr hoch sind, und für eine anti-HIV Therapie mit Cyclosporin-Derivaten ähnlich hohe Dosen zu erwarten sind, besteht der Wert der vorliegenden Erfindung darin, dass neue Cyclosporin-Derivate mit hoher anti-HIV Aktivität bereitgestellt werden, und dass deren Herstellung gleichzeitig in wenigen Schritten aus Cyclosporin A, einem bereits im Tonnenmasstab hergestellten Produkt erfolgen kann.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind demnach neue cyclische Peptide der allgemeinen Formel

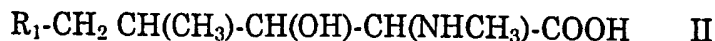


I

2

worin die Buchstaben A bis K Reste der folgenden Aminosäuren bedeuten:

- A ein substituiertes Homothreonin der allgemeinen Formel



in welcher R_1 n-Propyl oder Propenyl bedeutet und die Doppelbindung vorzugsweise trans konfiguriert ist,

- B alpha-Aminobuttersäure, Valin, Norvalin, oder Threonin,

- C eine (D)-Aminosäure der allgemeinen Formel



in der

R = $C_2 - C_6$ Alkyl, Alkenyl, Alkynyl, geradkettig oder verzweigt, wobei diese Gruppen noch durch Hydroxy, Amino, C_1-C_4 Alkylamino, C_1-C_4 Dialkylamino, Alkoxy oder Acyloxy substituiert sein können,

$COOR_2$, $CONHR_2$, wobei $R_2 = C_1-C_4$ Alkyl, geradkettig oder verzweigt sein kann,

$X-R_3$, wobei X = O, S, und $R_3 = C_1-C_4$ Alkyl, Alkenyl, Alkynyl, geradkettig oder verzweigt, und wobei wenn X = S, $R_3 =$ auch Aryl oder Heteroaryl sein kann,

Halogen, vorzugsweise Fluor,

Cyano,

CHR_4R_5 , wobei $R_4 =$ Wasserstoff, Methyl, Ethyl, Phenyl, und $R_5 =$ Wasserstoff, Hydroxy, Halogen, vorzugsweise Fluor, weiters Amino, C_1-C_4 Alkylamino, C_1-C_4 Dialkylamino, Acyloxy, vorzugsweise Acetyloxy, weiters tert-Butoxycarbonyl-amino-

3

- ethoxy-ethoxy-acetyloxy, Alkoxycarbonyl, vorzugsweise Butoxycarbonyl,
- D N-Methyl-gamma-hydroxy-leucin oder N-Methyl-gamma-acetyloxyleucin,
- E Valin,
- F, I, und J jeweils N-Methyllleucin,
- G Alanin,
- H (D)-Alanin, (D)-Serin, und
- K N-Methyl-Valin.

Ein wesentliches Element der vorliegenden Erfindung ist die Variation des Restes R in Formel III der Aminosaeure C.

Beispiele für den Rest R in Formel III sind C₁ - C₆ Alkyl, Alkenyl, Alkynyl, geradkettig oder verzweigt, wobei diese Gruppen noch durch Hydroxy, Alkyloxy, Acyloxy, C₁-C₄ Alkylamino, C₁-C₄ Dialkylamino, substituiert sein können. Beispiele hierfür sind Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, n-Butyl, Isobutyl, tertiär-Butyl, Pentyl, Isopentyl, Neopentyl, tertiär-Pentyl, Hexyl, Cyclopropylmethyl, Allyl, Butenyl, Pentenyl, Isopentenyl, Propargyl, Butinyl. Beispiele für die Alkyloxy und Acyloxy Substituenten im Rest R sind etwa Methoxy, Ethoxy, Propyloxy, beta-Methoxyethoxy, sowie Acetoxy oder Pivaloyloxy. Beispiele für die C₁-C₄ Alkylamino und C₁-C₄ Dialkylamino Substituenten im Rest R sind Methylamino, Dimethylamino, Ethylamino, Diethylamino, Propylamino, Isopropylamino, Dipropylamino, Diisopropylamino, tertiär-Butylamino. Der Rest R₂ in R kann die Bedeutung von Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, n-Butyl, Isobutyl, oder tertiär-Butyl haben. Ferner kann R auch die Bedeutung von Halogen oder Cyano haben. Der Rest R₃ in X- R₃ kann für geradkettig oder verzweigtes C₁-C₄ Alkyl, Alkenyl, oder Alkynyl stehen, wenn X = S auch für Aryl oder Heteroaryl. Beispiele für Aryl sind etwa Phenyl, 1-Naphthyl, 2-Naphthyl, für Heteroaryl etwa 2-Pyridyl, 3-Pyridyl, 4-Pyridyl, 2-Pyrimidinyl, 4-Pyrimidinyl, Pyrazinyl, Benzthiazol-2-yl.

4

Bevorzugte Verbindungen sind solche, in denen der Rest R_1 in A Propenyl bedeutet, B alpha-Aminobuttersäure, D N-Methyl-gamma-hydroxyleucin, E Valin, F, I, und J jeweils N-Methyllleucin, G Alanin, H (D)-Alanin und K N-Methylvalin bedeuten.

In dieser Konfiguration bedeutet der Rest R in der Formel III Methyl, Ethyl, Propyl, Allyl, Propargyl, Hydroxymethyl, Hydroxyethyl, Hydroxybenzyl, Aminomethyl, Methylaminomethyl, Dimethylaminomethyl, Ethylaminomethyl, Diethylaminomethyl, Propylaminomethyl, Isopropylaminomethyl, Dipropylaminomethyl, Diisopropylaminomethyl, tertiär-Butylaminomethyl, Fluormethyl, Methoxymethyl, Ethoxymethyl, Methoxycarbonyl, Ethoxycarbonyl, Propoxycarbonyl, Isobutyloxycarbonyl, Methylaminocarbonyl, Ethylaminocarbonyl, Propylaminocarbonyl, Isopropylaminocarbonyl, Phenylaminocarbonyl, Methoxycarbonylmethyl, Ethoxycarbonylmethyl, Propoxycarbonylmethyl, tertiär-Butoxycarbonylmethyl, Methoxy, Ethoxy, Propoxy, Isopropoxy, n-Butoxy, Isobutoxy, tertiär-Butoxy, Hydroxyethoxy, Methylthio, Ethylthio, Hydroxyethylthio, Propylthio, Isopropylthio, n-Butylthio, Isobutylthio, tertiär-Butylthio, Phenylthio, 2-Pyridylthio, Benzthiazol-2-ylthio, Cyano oder Fluor.

Die erfindungsgemaessen Verbindungen können hergestellt werden, indem man aus cyclischen Peptiden der allgemeinen Formel I, in welcher D die Bedeutung von N-Methyllleucin hat, mit geeigneten Basen ein Polyanion herstellt, dieses mit geeigneten Elektrophilen zur Reaktion bringt, und den neu eingeführten Rest gegebenenfalls noch weiter umwandelt, um die gewünschte Substitution der Aminosaeure C zu erhalten. Die so erhaltenen Produkte werden anschliessend durch mikrobielle Transformation hydroxyliert. Eine andere Möglichkeit zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen besteht darin, dass man von cyclischen Peptiden der allgemeinen Formel 1, in welcher die Aminosaeure D die Bedeutung von N-Methyl-gamma-hydroxyleucin hat, wie oben beschrieben mit geeigneten Basen ein Polyanion herstellt, dieses mit geeigneten Elektrophilen zur Reaktion bringt, und den neu eingeführten Rest gegebenenfalls noch weiter umwandelt, um die gewünschte Substitution der Aminosaeure C zu erhalten. Die Herstellung der Polyanionen erfolgt, indem man eine Lösung des Edukts

5

in einem geeigneten wasserfreien Lösungsmittel wie etwa Tetrahydrofuran bei tiefen Temperaturen, vorzugsweise bei Temperaturen unter minus vierzig Grad mit einem Überschuss einer geeigneten Base, vorzugsweise Lithium-Diisopropylamid, gelöst in wasserfreiem Tetrahydrofuran zur Reaktion bringt und das resultierende Polyanion mit einem geeigneten Elektrophil abfaengt. Dieses Verfahren entspricht im wesentlichen jenem wie von Seebach beschrieben (D. Seebach et al., *Helv. Chim. Acta*, Vol. 76, 1564 - 1590, 1993). Weitere geeignete Basen sind andere Alkaliamide, wie z.B. Lithiumdiethylamid oder Lithiumhexamethyldisilazid sowie Alkalialkoholate wie etwa Kaliummethylat, Kalium tertiär-butylat, Kalium tertiär-amylat oder Natriummethylat. Geeignete Elektrophile sind zum Beispiel Alkylhalogenide, wie etwa Methyljodid, Ethyljodid, Allylbromid, Benzylbromid, Alkoxymethylhalogenide wie z.B. Methoxymethylchlorid, Methoxyethoxymethylchlorid, Benzyloxymethylchlorid aber auch Carbonylverbindungen, wie Aldehyde oder manche Ketone, z.B. Formaldehyd, Acetaldehyd, Benzaldehyd, Aceton, cyclische Ketone wie Cyclopropanon und dessen höhere Homologe, sowie reaktive Derivate von Kohlensäure wie Iso-cyanate und von organischen Carbonsäuren wie etwa Ester, z.B. Ethylformiat, Diethyloxalat, Benzoesäureethylester, Nicotinsäureethylester. Weitere in Frage kommende Elektrophile sind Halogene sowie andere Quellen von positivem Halogen wie N-Chlor-succinimid, N-Brom-succinimid, N-Fluor-N-neopentyl-p-toluolsulfonamid, Perchlorylfluorid, N-Halogencyane, wie Chlorcyan, aber auch Disulfide und deren Sulfoniumsalze, wie etwa Dimethylsulfid, Dimethylthiomethylsulfoniumjodid, Diphenyldisulfid, Dipyridyldisulfid, 2,2'-Benzthiazolyldisulfid. Die Reaktionen dieser Elektrophile führen zur Ausbildung eines neuen Chiralitätszentrums. Je nach Reaktionsbedingungen erhält man Gemische, in welchen eines der beiden möglichen Diastereomeren überwiegt. Diese neu gebildeten Diastereomeren unterscheiden sich voneinander dadurch, daß im einen Fall die Aminosäure C in der allgemeinen Formel I die (D)-Konfiguration, im anderen die (L)-Konfiguration hat. In der vorliegenden Erfindung werden jene Diastereomeren bevorzugt, in welchen der Aminosäure C in der allgemeinen Formel I die (D)-Konfiguration zukommt. Die Faktoren, welche zur bevorzugten Ausbildung des (D)-Diastereomeren oder (L)-Diastereomeren

führen, sowie der Einfluß der verwendeten Basen und eine breite Reihe von Elektrophilen wurden für den Fall von Cyclosporin A als Edukt von Seebach genau untersucht, sind in der Literatur beschrieben (D.Seebach et al., Helv. Chim. Acta, Vol.76, 1564 - 1590, 1993) und wurden von anderen Autoren kritisch kommentiert (S.David, Chemtracts Organic Chemistry, Vol. 6, 303 - 306, 1993). Die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen experimentellen Bedingungen führen überwiegend zur Ausbildung jener Diastereomeren, in welchen das neu gebildete Chiralitätszentrum der Aminosäure C die (D)-Konfiguration hat. In der vorliegenden Erfindung wurde gezeigt, daß dies auch dann zutrifft, wenn man 4-(gamma-Hydroxy)-N-methyleucin)-cyclosporin anstelle von Cyclosporin A als Edukt verwendet. Die Verwendung von 4-(gamma-Hydroxy)-N-methyleucin)-cyclosporin als Edukt für solche Transformationen ist neu und mit Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Auch in diesen Fällen haben die erhaltenen Produkte im allgemeinen überwiegend die Konfiguration einer (D)-Aminosäure.

Die mikrobielle Hydroxylierung der gamma-Position der Aminosäure in Position D kann mit verschiedenen Mikroorganismen der Gattung Actinomyces durchgeführt werden, wie etwa beschrieben in Eur. J. Immunol. 1987, 17, 1359, mit *Sebekia benihana*. Die Bedeutung dieser Transformation besteht im wesentlichen darin, daß in einem Schritt die immunsuppressive Wirkung von Cyclosporin praktisch vollkommen eliminiert wird.

Die Verbindungen der Formel I besitzen bei geringer Toxizität interessante biologische Eigenschaften, insbesondere solche von Hemmwirkung gegen das Humane Immundefizienzvirus (HIV) und können daher als Heilmittel bei Infektionen mit HIV verwendet werden. Diese Hemmwirkung wurde in geeigneten in vitro Versuchen ab einer Konzentration von 0.05 bis 50 mg/l festgestellt. Als Heilmittel können die Verbindungen der Formel I und gegebenenfalls ihre Salze allein oder in geeigneten Arzneiformen gemeinsam mit anorganischen oder organischen pharmakologisch indifferenten Hilfsstoffen verwendet werden.

Beispiel 1:

Herstellung von 3-N-Methyl-(D)-serin-4-(gamma-hydroxy)-N-methyllleucin)-cyclosporin.

Die Einführung einer Hydroxygruppe in die gamma-Stellung des N-Methyllleucins in Position 4 von Cyclosporin A durch mikrobielle Transformation mit *Sebekia benihana* ist in Eur. J. Immunol., 1987, Vol. 17, 1359 beschrieben. Aus 3-N-Methyl-(D)serin-cyclosporin läßt sich durch diese Biotransformation 3-N-Methyl-(D)serin-4-gamma-hydroxy-N-methyllleucin-cyclosporin herstellen. Der verwendete Stamm hat die Bezeichnung NRLL 11111 und gehört zur Familie der *Actinoplanaceae*.

Startkultur:

Agarkulturen von NRLL 11111 wurden bei 27° über 10 Tage in einem sterilisierten, auf pH 7 eingestellten Medium bestehend aus 20 g Glucose, 10 g Hefeextrakt (Gistex), 10 g Pepton, 40 g Stärke, 2 g Calciumcarbonat, 40 g Agar, und 1 l Wasser angezüchtet.

Vorkultur:

Das Vorkulturmedium bestand aus 35 g Glucose, 50 g Stärke, 12.5 g Pepton, 50 g Malzextrakt, 22.5 g Hefeextrakt, 5 g Calciumcarbonat in 5 l Wasser. Ausserdem enthielt dieses Medium 5 ml einer Lösung von Spurenelementen (1 ml konz. Schwefelsäure, 5 g Eisen(II)sulfat Heptahydrat, 50 mg KJ, 100 mg Borsäure, 4 g Zinksulfat Heptahydrat, 2 g Mangan(II)chlorid Tetrahydrat, 200 mg Kupfersulfat Pentahydrat, und 2 g Kobaltchlorid Hexahydrat in 1 l destilliertem Wasser). Sporen und Mycel der Startkultur wurden in 10 ml einer 0.9%igen Salzlösung suspendiert und die Suspension zu 100 ml sterilisiertem Vorkulturmedium gegeben. Diese Kultur wurde 4 Tage bei 27° auf einem Schüttelrotor bei 200 Umdrehungen/Minute geschüttelt. Nach 4 Tagen wurde die Vorkultur mit sterilisiertem Vorkulturmedium verdünnt (1:10) und weitere 3 Tage geschüttelt.

Hauptkultur:

Das Fermentationsmedium für die Hauptkultur (1 l destilliertes Wasser, 1 ml der obig beschriebenen Lösung von Spurenelementen, 200 mg Ammoniummolybdat, 255 mg Kaliumhydrogenphosphat, 120 mg Kaliumdihydrogenphosphat, 100 mg Magnesiumsulfat Heptahydrat, 50 mg Calciumchlorid Hexahydrat, 12.5 g Sojabohnenmehl, 2.5 g Hefeextrakt, 10 g Stärke, 10 g Dextrin, 10 g Cerelese) wurde auf pH 7.3 eingestellt, und 20 Minuten bei 120° sterilisiert. Dann wurden 10 ml der oben erhaltenen Vorkultur zugesetzt, die Mischung 24 Stunden bei 27° mittels eines Schüttelrotors geschüttelt und nach Zugabe von 100 mg 3-N-Methyl-(D)-serin-cyclosporin weitere 3 Tage geschüttelt.

Isolation von 3-N-Methyl-(D)-serin-4-(gamma-hydroxy)-N-methyllleucin)-cyclosporin

Die Hauptkultur wird durch Filtration vom Mycel befreit und das Filtrat 5x mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden in einem Rotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand an 250 g Silicagel (Silicagel Merck, Korngröße 0.4-0.063 mesh) chromatographiert. Nochmalige Chromatographie der Cyclosporinfraktionen an 70 g Silicagel ergibt 15 mg 3-N-Methyl-(D)-serin-4-(gamma-hydroxy)-N-methyllleucin)-cyclosporin als amorphes Pulver. Die optische Drehung dieser Substanz beträgt $[\alpha]_D = -166^\circ$ ($c = 0.5$, Dichlormethan). Dieses Produkt läßt sich aus Methanol kristallisieren, wobei die erhaltenen Kristalle bei 150 - 152° schmelzen. Im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum in deuteriertem DMSO erscheinen die beiden Methylgruppen des N-Methyl-gamma-hydroxyleucins als Singulette bei 1.05 ppm.

Beispiel 2:

Herstellung von 3-N-Methyl-(D)-serin-cyclosporin

Die Herstellung dieser Substanz ist in der Literatur beschrieben von D. Seebach, et al., *Helv. Chimica Acta*, Vol. 76, 1564-1590, 1993.

Diese Substanz kann auch auf folgendem Weg erhalten werden:

2a) 3- α -Methoxycarbonyl-cyclosporin

Zu einer Lösung von 8.7 ml Diisopropylamin in 800 ml trockenem THF werden bei 0°C unter Inertgas-Atmosphäre (Argon) 30 ml einer 1.6 molaren Lösung von n-Butyllithium in Hexan getropft. Nach 20 Minuten bei 0°C wird die Lösung auf minus 78°C gekühlt und portionenweise mit einer auf minus 78°C vorgekühlten Lösung von 10.0 g Cyclosporin A in 150 ml trockenem Tetrahydrofuran versetzt. Das resultierende Gemisch wird 1 Stunde bei minus 78°C gerührt, wonach ein Strom von trockenem CO₂ Gas eingeleitet wird. Anschliessend werden 6.4 ml Chlorameisensäuremethylester zugetropft und der Ansatz 2 Stunden bei minus 78°C gerührt. Nach Zugabe von 1.1 ml Diisopropylamin lässt man die Temperatur auf 20°C ansteigen, rührt das Gemisch 14 Stunden bei dieser Temperatur und erhitzt anschliessend 45 Minuten am Rückfluss. Nachdem das Gemisch auf 20°C abgekühlt ist, gibt man 100 ml 10%ige Phosphorsäure zu, extrahiert die Wasserphase mit 600 ml Essigester. Die Wasserphase wird mehrmals mit Essigester nachextrahiert. Die organischen Extrakte werden vereinigt, mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne gebracht. Das resultierende Öl wird an 500 g Kieselgel (0.02-0.05 mesh) unter Verwendung eines 4:1 Gemisches von Essigester und Cyclohexan chromatographiert. Fraktionen, welche das Produkt enthalten, werden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält so 1.9 g 3- α -Methoxycarbonyl-cyclosporin als farbloses Pulver vom Schmelzpunkt 138°.

2b) 3-N-Methyl-D-serin-cyclosporin

Zu einer Lösung von 1.0 g 3- α -Methoxycarbonyl-cyclosporin in 30 ml trockenem Tetrahydrofuran werden bei 0°C 2.4 ml einer 2.0 molaren Lösung von Lithiumborhydrid in THF getropft. Diese Mischung wird 22 Stunden bei 0°C gerührt. Dann werden 2 ml destilliertes Wasser zugesetzt, gefolgt von tropfenweiser Zugabe von 10%iger Salzsäure und weiteren 10 ml destilliertem Wasser. Dieses Gemisch wird mit 25 ml Essigester geschüt-

telt, die Phasen getrennt, und die Wasserphase noch 3x mit je 50 ml Essigester nachextrahiert. Die vereinigten Extrakte werden mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird an 300 g Kieselgel unter Verwendung von Essigester als Elutionsmittel chromatographiert. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und im Vakuum eingeengt, wobei man 401 mg 3-N-Methyl-(D)-serin-cyclosporin als farbloses amorphes Pulver erhält. Der Schmelzpunkt dieses Produktes beträgt 128-130°.

Beispiel 3:

Herstellung von 3-N-Methyl-(D)-serin-4-(gamma-hydroxy)-N-methyleucin-cyclosporin aus 4-(gamma-hydroxy)-N-methyleucin-cyclosporin

Zu einer Lösung von 1.12 ml Diisopropylamin in 50 ml trockenem THF werden bei 0°C unter Inertgas-Atmosphäre (Argon) 5 ml einer 1.6 molaren Lösung von n-Butyllithium in Hexan getropft. Nach 20 Minuten bei 0°C wird die Lösung auf minus 78°C gekühlt und portionenweise mit einer auf minus 78°C vorgekühlten Lösung von 1.2 g 4-(gamma-hydroxy)-N-methyleucin-cyclosporin in 50 ml trockenem Tetrahydrofuran versetzt. Das resultierende Gemisch wird 1 Stunde bei minus 78°C gerührt, wonach mittels eines leichten Argon-Stroms monomerer Formaldehyd in das Reaktionsgemisch eingeleitet wird. Der Ansatz wird noch 2 Stunden bei minus 78°C gerührt. Dann läßt man die Temperatur auf 20°C ansteigen, gibt 10 ml 10%ige Phosphorsäure zu und extrahiert die Wasserphase mit 100 ml Essigester. Die Wasserphase wird mehrmals mit Essigester nachextrahiert. Die organischen Extrakte werden vereinigt, mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne gebracht. Das resultierende Öl wird an 100 g Kieselgel (0.02-0.05 mesh) unter Verwendung von Essigester als Elutionsmittel chromatographiert. Fraktionen, welche das Produkt enthalten, werden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält so 5 mg 3-N-Methyl-(D)-serin-4-(gamma-hydroxy)-N-methyleucin-cyclosporin. Die auf diesem Weg hergestellte Substanz ist nach allen physika-

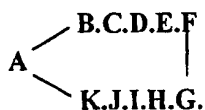
lisch-chemischen Kriterien identisch mit der nach Beispiel 1 hergestellten Substanz.

Test auf antivirale Aktivität:

Für diesen Test wurde die von I.Miyoshi et al. beschriebene (Nature 294, pp 770-771, 1981) T Zelllinie MT4 verwendet. Der HIV-1 (Stamm IIIB) wurde während 2 Stunden bei 37° an den Zellen adsorbiert. Dann wurde das Inokulum entfernt und die infizierten Zellen auf Gewebekulturplatten gegeben, welche die Testverbindung in verschiedenen Konzentrationen enthielt. Dabei wurde das Virusinokulum so gewählt, daß bis zum vierten Tag nach der Infektion die Konzentration an viralem p24 Antigen im Zellüberstand exponentiell anstieg. Am dritten und vierten Tag nach der Infektion wurden die Zellüberstände mittels ELISA auf p24 Antigen analysiert. IC₅₀ Werte wurden durch Vergleich der p24 Konzentrationen im Überstand der infizierten, mit Substanz behandelten Zellen und jener der unbehandelten infizierten Kontrolle ermittelt. Für 3-N-Methyl-(D)serin-4-gamma-hydroxy-N-methyleucin-cyclosporin wurde in diesem Test eine IC₅₀ von 0.1 mg/l ermittelt. Der entsprechende Wert für Cyclosporin A beträgt im Vergleich dazu 0.5 mg/l.

Patentansprüche

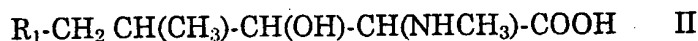
1. Neue cyclische Peptide der allgemeinen Formel



I

worin die Buchstaben A bis K Reste der folgenden Aminosäuren bedeuten:

A ein substituiertes Homothreonin der allgemeinen Formel



in welcher R_1 n-Propyl oder Propenyl bedeutet und die Doppelbindung vorzugsweise trans konfiguriert ist,

B alpha-Aminobuttersäure, Valin, Norvalin, oder Threonin,

C eine (D)-Aminosäure der allgemeinen Formel



in der

R = $C_2 - C_6$ Alkyl, Alkenyl, Alkynyl, geradkettig oder verzweigt, wobei diese Gruppen noch durch Hydroxy, Amino, $C_1\text{-}C_4$ Alkylamino, $C_1\text{-}C_4$ Dialkylamino, Alkoxy oder Acyloxy substituiert sein können,

COOR_2 , CONHR_2 , wobei $\text{R}_2 = \text{C}_1\text{-C}_4$ Alkyl, geradkettig oder verzweigt sein kann,

X-R_3 , wobei $\text{X} = \text{O}, \text{S}$, und $\text{R}_3 = \text{C}_1\text{-C}_4$ Alkyl, Alkenyl, Alkinyl, geradkettig oder verzweigt, und wobei wenn $\text{X} = \text{S}$, $\text{R}_3 =$ auch Aryl oder Heteroaryl sein kann,

Halogen, vorzugsweise Fluor,

Cyano,

CHR_4R_5 , wobei $\text{R}_4 =$ Wasserstoff, Methyl, Ethyl, Phenyl, und $\text{R}_5 =$ Wasserstoff, Hydroxy, Halogen, vorzugsweise Fluor, weiters Amino, $\text{C}_1\text{-C}_4$ Alkylamino, $\text{C}_1\text{-C}_4$ Dialkylamino, Acyloxy, vorzugsweise Acetyloxy, weiters tert-Butoxycarbonyl-amino-ethoxy-ethoxy-acetyloxy, Alkoxycarbonyl, vorzugsweise Butoxycarbonyl,

D N-Methyl-gamma-hydroxy-leucin oder N-Methyl-gamma acetyloxyleucin

E Valin,

F, I, und J jeweils N-Methyleucin,

G Alanin,

H (D)-Alanin, (D)-Serin, und

K N-Methyl-Valin.

2. Cyclische Peptide der allgemeinen Formel I nach Anspruch 1, in welcher der Rest R_1 in A Propenyl, B alpha-Aminobuttersäure, D N-Methyl-gamma-hydroxyleucin, E Valin, F, I, und J jeweils N-Methyleucin, G Alanin, H (D)-Alanin und K N-Methylvalin bedeutet.

3. Cyclische Peptide der allgemeinen Formel I nach Anspruch 2, in welcher der Rest R in der Formel III Methyl, Ethyl, Propyl, Allyl, Propargyl, Hydroxymethyl, Hydroxyethyl, Hydroxybenzyl, Aminomethyl, Methylaminomethyl, Dimethylaminomethyl, Ethylaminomethyl, Diethylaminomethyl, Propylaminomethyl, Isopropylami-

nomethyl, Dipropylaminomethyl, Diisopropylaminomethyl, tertiär-Butylaminomethyl, Fluormethyl, Methoxymethyl, Ethoxymethyl, Methoxycarbonyl, Ethoxycarbonyl, Propoxycarbonyl, Isobutyloxy-carbonyl, Methylaminocarbonyl, Ethylaminocarbonyl, Propylamino-carbonyl, Isopropylaminocarbonyl, Phenylaminocarbonyl, Methoxy-carbonylmethyl, Ethoxycarbonylmethyl, Propoxycarbonylmethyl, tertiär-Butoxycarbonylmethyl, Methoxy, Ethoxy, Propoxy, Isopropoxy, n-Butoxy, Isobutoxy, tertiär-Butoxy, Hydroxyethoxy, Methylthio, Ethylthio, Hydroxyethylthio, Propylthio, Isopropylthio, n-Butylthio, Isobutylthio, tertiär-Butylthio, Phenylthio, 2-Pyridylthio oder Benzthiazol-2-yl-thio bedeutet.

4. 3-N-Methyl-(D)-serin-4-(gamma-hydroxy)-N-methyllleucin-cyclosporin
5. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I, in welcher C die oben angegebene Bedeutung und D die Bedeutung von N-Methyl-gamma-hydroxyleucin hat, dadurch gekennzeichnet, dass man ein cyclisches Peptid der allgemeinen Formel I, in welcher D die Bedeutung von N-Methyllleucin hat, mit Hilfe eines Mikroorganismus hydroxyliert.
6. Verfahren nach Anspruch 5 dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus *Sebekia benihana* ist.
7. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I, in welcher D die Bedeutung von N-Methyl-gamma-hydroxyleucin hat, dadurch gekennzeichnet, dass man ein cyclisches Peptid der allgemeinen Formel I, in welcher C Sarcosin und D N-Methyl-gamma-hydroxyleucin bedeutet, mit geeigneten Basen in ein Polyanion überführt und dieses durch Reaktion mit geeigneten Elektrophilen in die Produkte nach Anspruch 1 umwandelt.

8. Eine pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend ein oder mehrere cyclische Peptide nach Anspruch 1 zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Verdünnungsmittel oder Träger.
9. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung oder Vorbeugung von Infektionen mit dem Humanen Immundefizienzvirus (HIV).

This Page Blank (uspto)